

Sex	Dose (mg/kg)	Animal No.	CSF concentration of P092 (ng/mL)
Male	1	20101	BLQ
		20102	BLQ
		20103	BLQ
		20104	BLQ
		20105	BLQ
	10	20201	BLQ
		20202	BLQ
		20204	BLQ
	25	20301	146
		20303	BLQ
20305		6.54	
Female	1	60101	BLQ
		60102	BLQ
		60103	BLQ
		60104	BLQ
		60105	BLQ
	10	60201	BLQ
		60202	37.2
		60203	BLQ
		60204	BLQ
		60205	BLQ
	25	60301	7.91
		60302	BLQ
		60303	BLQ
		60305	BLQ

BLQ: Below the lower limit of quantification (< 5 ng/mL)

以上のことから、P092 マレイン酸塩を静脈内投与する場合、薬物による血管障害が惹起されてしまうことから、低速持続投与は不適と考えられた。

7. ヒト血液に対する溶血性試験に対する資料

P092・マレイン酸塩を生理食塩液に 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5 及び 1 mg/mL の濃度（フリー体換算濃度）で溶解させ、健常ヒト血液（2例）と等量混合して、溶血性について検討した。溶血性の評価は、遠心分離後の上清を目視、及び上清中のヘモグロビン濃度と LDH（Lactate Dehydrogenase、乳酸脱水素酵素）濃度を測定することにより行った。生理食塩液をヒト血液に等量加えたものを比較対照とした。

その結果、目視検査では、P092 調製液濃度 0.5 あるいは 1 mg/mL 液より溶血性が確認された。上清中ヘモグロビン濃度を測定したところ、1 mg/mL 液において高値が認められた。一方、上清中 LDH を測定したところ、0.2 mg/mL 以上の濃度より高値が認められた。LDH 測定値の結果から、0.2 mg/mL 以上の濃度では細胞障害性があることが示唆された。

(表二-9) P092 マレイン酸塩のヒト血液に対する溶血性

P092・マレイン酸塩 調製液濃度 (mg/mL)	コード 番号	測定項目		
		目視*	ヘモグロビン (g/dL)	LDH (U/L)
0	M1	----	0.1	163
	M2	----	0	168
	平均		0.05	165.5
0.01	M1	----	0.1	134
	M2	----	0	130
	平均		0.05	132
0.02	M1	----	0	170
	M2	----	0	153
	平均		0	161.5
0.05	M1	----	0.1	141
	M2	----	0.1	151
	平均		0.1	146
0.1	M1	----	0.1	150
	M2	----	0	151
	平均		0.05	150.5
0.2	M1	---	0.1	416
	M2	---	0	307
	平均		0.05	361.5
0.5	M1	+	0.1	679
	M2	----	0.1	589
	平均		0.1	634
1	M1	++	0.4	1146
	M2	++	0.2	754
	平均		0.3	950

* ----: 溶血なし, +: 弱溶血(赤淡色), ++: 溶血(赤色)

以上のことから、本試験条件下では、P092 マレイン酸塩の生理食塩溶液は、ヒト血球に対して 0.2 mg/mL 以上の濃度では溶血性を示すが、0.1 mg/mL 以下の濃度では溶血性を示さないと結論した。

8. 参考文献


- 1) クロイツフェルト・ヤコブ病診療マニュアル (改訂版) 厚生労働省特定疾患対策研究事業 厚生労働省遅発性ウイルス感染調査研究班 平成 14 年 1 月 24 日
- 2) プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業) 平成 23 年度総括研究報告書
- 3) Kuwata K, et al. Hot spots in prion protein for pathogenic conversion. PNAS 2007;104(29):11921-11926
- 4) Kimura T, et al. Synthesis of GN8 derivatives and evaluation of their anti-prion activity in TSE-infected cells. Bioorganic & medicinal chemistry letters 2011;21(5):1502-1507

2. P092 のラット血中濃度測定法検討

最終報告書

P092 のラット血液中濃度測定法検討

(試験番号 : B140395)

本写しは原本と相違ありません
株式会社 L S I メディエンス 鹿島研究所 2014年7月4日
試験責任者 松元さよえ 

株式会社 L S I メディエンス

1. 陳述書

表題： P092 のラット血液中濃度測定法検討

試験番号： B140395

本最終報告書は試験結果を正しく反映したものである。

試験責任者：

2014 年 7 月 4 日

松元 さなえ



松元 さなえ

株式会社 L S I メディエンス

創薬支援事業本部 試験研究センター

分析代謝研究部

2. 目次

1. 陳述書.....	2
2. 目次.....	3
3. 試験実施概要.....	4
3.1 表題.....	4
3.2 試験番号.....	4
3.3 試験目的.....	4
3.4 適用ガイドライン.....	4
3.5 適用 GLP.....	4
3.6 試験委託者.....	4
3.7 試験受託者.....	4
3.8 試験施設.....	4
3.8.1 名称及び所在地.....	4
3.8.2 試験責任者.....	4
3.8.3 試験日程.....	5
3.8.4 保存.....	5
3.8.5 保存する資料.....	5
4. 試験責任者署名及び捺印.....	6
5. 要約.....	7
6. 材料及び方法.....	8
6.1 測定対象標準物質.....	8
6.2 内標準物質 (IS).....	8
6.3 ブランク血液.....	8
6.4 血液中 P092 濃度の測定方法.....	8
6.4.1 P092 標準試料溶液の調製.....	8
6.4.2 IS 試料溶液の調製.....	9
6.4.3 検量線用標準試料溶液の調製.....	9
6.4.4 QC サンプルの調製.....	10
6.4.5 血液試料の前処理方法 (分析フロー).....	10
6.4.6 分析条件.....	10
6.4.7 検量線.....	12
7. 結果.....	13
7.1 検量線及び日内再現性.....	13
7.2 血液及び血漿中濃度について.....	14
7.3 血液中安定性.....	14

最終項 : 15 ページ

3. 試験実施概要

3.1 表題

P092 のラット血液中濃度測定法検討

3.2 試験番号

B140395

3.3 試験目的

P092 のラット血液中濃度測定法を検討する。

3.4 適用ガイドライン

なし

3.5 適用 GLP

なし

3.6 試験委託者

国立大学法人岐阜大学

〒501-1193 岐阜県岐阜市柳戸 1 番 1

委託担当者：桑田 一夫

TEL：058-230-6143, FAX：058-230-6144

3.7 試験受託者

株式会社 L S I メディエンス

〒101-8517 東京都千代田区内神田一丁目 13 番 4 号

3.8 試験施設

3.8.1 名称及び所在地

株式会社 L S I メディエンス 鹿島研究所

〒314-0255 茨城県神栖市砂山 14 番地 1

3.8.2 試験責任者

松元 さなえ

株式会社 L S I メディエンス

創薬支援事業本部 試験研究センター 分析代謝研究部

TEL：0479-46-4024, FAX：0479-46-3173

E-mail: Matsumoto.Sanae@mm.medience.co.jp

3.8.3 試験日程

試験開始： 2014年 5月 8日
実験終了： 2014年 6月 20日
試験終了： 本最終報告書への試験責任者署名日とする

3.8.4 保存

次項に示す試験関係資料を試験施設の資料保存室に保存する。保存期間は試験終了後 10 年間とし、以後の保存は試験委託者と協議の上、決定する。

3.8.5 保存する資料

- (1) 試験計画書
- (2) 標準物質に関する資料
- (3) 試験結果に関する資料
- (4) 通信文書等の記録文書
- (5) 最終報告書

4. 試験責任者署名及び捺印

表題： P092 のラット血液中濃度測定法検討

試験番号： B140395

試験責任者：

2014 年 7 月 4 日

松元 さなえ



松元 さなえ

株式会社 L S I メディエンス

創薬支援事業本部 試験研究センター

分析代謝研究部

5. 要約

ラット血液中 P092 濃度測定法を検討した。検討した方法で検量線及び日内再現性は許容基準を満たした。

P092 の添加血液を遠心分離して得られた血漿中濃度は、血液中濃度の 1/4 程度もしくはそれより低い濃度であり、血液に P092 を添加した場合、大部分が血漿以外の成分に移行することが示唆された。

血液中の安定性を確認した。室温では 24 時間後、約 25%減少したのに対して、冷蔵では顕著な減少は認められなかった。

6. 材料及び方法

6.1 測定対象標準物質

名称： P092
ロット番号： 20120711
保存条件： 室温（許容範囲：10～30℃）
保管場所： 被験物質保管場所（41），（15）
取扱上の注意： 保護具（ゴム手袋，眼鏡及びマスク）着用

6.2 内標準物質（IS）

名称： p-アセトアミドフェノール
ロット番号： WEQ6871
分子量： 151.16
保存条件： 室温（許容範囲：10～30℃），遮光
保管場所： 被験物質保管場所（41）
製造元： 和光純薬工業株式会社
取扱上の注意： 保護具（ゴム手袋，眼鏡及びマスク）着用

6.3 ブランク血液

動物種： ラット
系統： Crl:CD (SD)
投与歴： なし
抗凝固剤： ヘパリンナトリウム
入手先： 日本チャールス・リバー株式会社

6.4 血液中 P092 濃度の測定方法

6.4.1 P092 標準試料溶液の調製

P092 を 10.0 mg 正確に量り，メタノールに溶解し，全量を 50 mL とした（200 µg/mL）（ガラス製メスフラスコを使用）．溶解の際，超音波処理を実施した．この溶液を P092 標準試料原液（SS）とし，次表に従ってメタノールで順次希釈し，以下の標準試料溶液を調製した．
P092 標準試料原液及び溶液はポリプロピレン（PP）製容器にて冷蔵・遮光保存（許容範囲：1～10℃）し，使用期限は調製後 97 日間とした．

標準試料溶液 略称	標準試料溶液濃度 (ng/mL)	使用標準試料溶液 略称	使用量 (μ L)*	メタノール 添加量(μ L)*
WS-40000	40000	SS	200	800
WS-4000	4000	WS-40000	100	900
WS-1000	1000	WS-4000	250	750
WS-800	800	WS-4000	200	800
WS-500	500	WS-1000	500	500
WS-200	200	WS-1000	200	800
WS-100	100	WS-500	200	800
WS-50	50	WS-500	100	900
WS-20	20	WS-200	100	900
WS-10	10	WS-100	100	900
WS-5	5	WS-50	100	900

* : マイクロピペットを使用

6.4.2 IS 試料溶液の調製

IS を 5 mg 正確に量り、メタノールに溶解、全量を 50 mL として IS 試料原液 (100 μ g/mL) を調製した (ガラス製メスフラスコを使用)。この溶液を IS 試料原液 (ISSS) とし、次表に従ってメタノールで希釈し IS 試料溶液 (200 ng/mL, ISWS) を調製した。

IS 試料原液及び溶液は PP 製容器にて冷蔵・遮光保存 (許容範囲 : 1~10°C) し、使用期限は調製後 97 日間とした。

IS 試料溶液 略称	IS 試料溶液濃度	使用 IS 試料溶液 略称	使用量 (μ L)*	メタノール添加量 (μ L)*
ISWS-1	5 μ g/mL	ISSS	50	950
ISWS	200 ng/mL	ISWS-1	40	960

* : マイクロピペットを使用

6.4.3 検量線用標準試料溶液の調製

PP 製マイクロチューブにブランク血液 20 μ L を分取後、ブランク試料、ゼロ試料についてはメタノールを 20 μ L、検量線用標準試料溶液 (C1~C8) については、次表に従い P092 標準試料溶液を 20 μ L 添加した。

略称	血液中濃度 (ng/mL)	P092 標準試料溶液略称
C1 (LLOQ)	5	WS-5
C2	10	WS-10
C3	20	WS-20
C4	50	WS-50
C5	100	WS-100
C6	200	WS-200
C7	500	WS-500
C8 (ULOQ)	1000	WS-1000

LLOQ: lower limit of quantification

ULOQ: upper limit of quantification

6.4.4 QC サンプルの調製

PP 製マイクロチューブにブランク血漿 20 μ L を分取後、次表に従い P092 標準試料溶液を 20 μ L 添加した。

略称	血漿中濃度 (ng/mL)	P092 標準試料溶液略称
Low QC	10	WS-10
Middle QC	50	WS-50
High QC	800	WS-800

6.4.5 血液試料の前処理方法（分析フロー）

- (1) PP 製マイクロチューブに血液 20 μ L を分取した。
- (2) メタノール 20 μ L を添加した。
(検量線用標準試料溶液調製時は P092 標準試料溶液)
- (3) ISWS（ブランク試料調製時はメタノール）60 μ L を添加した。
- (4) ミキサーを用いて攪拌した。
- (5) 遠心分離（20,400 \times g, 3 分間, 設定温度：4 $^{\circ}$ C）した。
- (6) 上清を 50 μ L 採取した。
- (7) 10 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液を 50 μ L 添加, 混合した。
- (8) 次項の条件で測定した。

6.4.6 分析条件

6.4.6.1 装置

送液ポンプ： LC-20AD (Shimadzu Corporation)
脱気装置： DGU-20A3 (Shimadzu Corporation)

カラムオープン： CTO-20AC (Shimadzu Corporation)
 オートサンプラ： SIL-20AC・HT (Shimadzu Corporation)
 質量分析装置： API 4000 (AB SCIEX)

6.4.6.2 HPLC 条件

カラム： XBridge C18, 3.5 μ m, 3.0 mm I.D. \times 50 mm (Waters Corporation)
 カラム温度： 50°C
 移動相 A： 10 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液
 移動相 B： メタノール/ギ酸 (1000:1, v/v)

グラジエント条件 1：	Time (min)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
	0.00	35	65
	3.50	35	65
	3.51	10	90
	4.00	10	90
	4.01	35	65
	6.00	35	65

グラジエント条件 2：	Time (min)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
	0.00	70	30
	3.00	10	90
	4.00	10	90
	4.01	70	30
	6.00	70	30

当初、グラジエント条件 1 で測定を実施していたが、IS ピークの直前にピークが見られるようになったため、グラジエント条件を変更しグラジエント条件 2 でも測定を実施した。

流速： 0.25 mL/min
 注入量： 10 μ L
 オートサンプラ設定温度： 10°C
 ニードル洗浄溶媒： メタノール

6.4.6.3 MS/MS 条件

Ionization method： ESI (Electrospray Ionization, Turbo Ion Spray)
 Polarity： Positive
 Scan type： MRM (Multiple reaction monitoring)
 Ion spray voltage (IS)： 5500 V

Heater gas temperature (TEM) :	500°C
Nebulizer gas (GS1) :	Air, 50 psi
Heater gas (GS2) :	Air, 85 psi
Curtain gas flow (CUR) :	N ₂ , 18 psi
Collision gas flow (CAD) :	N ₂ , 4
Entrance potential (EP) :	10 V
Monitor ion :	P092: <i>m/z</i> 252 > 84 IS: <i>m/z</i> 152 > 110

6.4.7 検量線

ブランク試料, ゼロ試料及び 8 濃度の検量線用標準試料溶液を n=1 で調製し, それぞれから測定実測試料を n=1 で調製, 測定した.

ブランク試料, ゼロ試料の 2 検体は, LC-MS/MS 測定のバックグラウンド確認のために測定した.

検量線用標準試料溶液につき, P092 の IS に対するピーク面積比を, 添加濃度に対し一次回帰して得られる直線を検量線とした. 検量線には, 1/x の重み付け (x : 血液中 P092 濃度) を用いた. P092 の各濃度における真度 (%) を算出した.

$$\text{真度 (\%)} = \frac{\text{定量値}}{\text{理論値}} \times 100$$

<許容基準>

ブランク及びゼロ試料における P092 及び IS の溶出位置に夾雑ピークが検出されていないこと. 検出された場合, 夾雑ピークのピーク面積が, LLOQ サンプルの P092 及び IS のピーク面積に対してそれぞれ 20.0 及び 5.0%未満であること.

検量線用標準試料溶液の 8 濃度中, 定量下限及び上限を含む 6 濃度以上において, 真度が理論値の±15.0% (LLOQ では±20.0%) 以内であること.

7. 結果

ラット血液中 P092 濃度測定法を検討した。検討した前処理法及び分析条件は 6.4 項に記載し、本法で以下の項目について検討した。

7.1 検量線及び日内再現性

検量線

6.4.3 項及び 6.4.7 項に従い検量線を作成した結果、許容基準を満たした。

Analyte	Date	Calibration curve			Back ground (% of LLOQ)		
		Concentration (ng/mL)		Accuracy (%)	Sample	Peak area	
		Nominal	Measured			P092	IS
P092	2014/6/20	5	4.81	96.2	Blank	0	1963
		10	10.1	101.0		(0.0)	(0.3)
		20	20.9	104.5	Zero	0	576990
		50	51.7	103.4		(0.0)	--
		100	98.8	98.8	LLOQ	770	576305
		200	197	98.5			
		500	474	94.8			
		1000	1030	103.0			

LLOQ: Lower limit of quantification

Accuracy (%) = measured value/nominal value×100

The value in parenthesis denotes peak area ratio (%) of back ground peak area to that in LLOQ.

--: Not applicable

日内再現性

6.4.4 項に従い QC サンプルを調製し、各濃度 n=5 で測定した結果、真度は理論値の±15.0%以内、精度は 15.0%以内であった（許容基準：真度が理論値の±15.0%以内、精度が 15.0%以内）。

Analyte	Concentration (ng/mL)				Accuracy (%)	Precision (%)
	Nominal	Measured	Mean	SD		
P092	10	9.50	8.91	1.08	89.1	12.2
		7.70				
		8.09				
		8.87				
		10.4				
	50	42.7	43.7	2.3	87.4	5.3
		47.1				
		44.8				
		41.1				
		42.9				
	800	716	746	35	93.2	4.8
		732				
		766				
		717				
		798				

SD: Standard deviation

Accuracy (%) = mean value/nominal value×100

Precision (%) = standard deviation/mean value×100

7.2 血液及び血漿中濃度について

P092 を添加した血液を遠心分離し、得られた血漿を 6.4.5 項に記載の方法で前処理し、血液を用いて処理した検量線と一緒に測定した結果、

20 ng/mL の添加血液を遠心分離し、得られた血漿中濃度は 5.67 ng/mL であり、

800 ng/mL の添加血液を遠心分離し、得られた血漿中濃度は 138 ng/mL であった。

血液中濃度の 1/4 程度もしくはそれより低い濃度であり、血液に P092 を添加した場合、大部分が血漿以外の成分に移行することが示唆された。

7.3 血液中安定性

血液中の安定性を確認した。室温では 24 時間後、約 25%減少したのに対して、冷蔵では顕著な減少は認められなかった。

室温下安定性

Analyte	Concentration (ng/mL)			Residual ratio (%)		
	Nominal	Storage period	Measured			
P092	20	Just after preparation (Initial)	16.5	15.7	--	
			14.7			
			15.9			
	800	RT 24 h		12.6	11.5	73.5
				10.9		
				11.1		
		Just after preparation (Initial)		804	802	--
				814		
				789		
	RT 24 h		687	614	76.6	
		485				
		671				

Residual ratio (%) = mean value after storage/mean initial value × 100

RT: at room temperature, --: not applicable

冷蔵下安定性

Analyte	Concentration (ng/mL)			Residual ratio (%)		
	Nominal	Storage period	Measured			
P092	20	Just after preparation (Initial)	21.6	20.0	--	
			21.9			
			16.6			
		Ref 4 h		24.1	25.6	127.6
				26.3		
				26.3		
	800	Ref 24 h		24.9	24.6	122.6
				24.0		
				24.8		
		Just after preparation (Initial)		842	834	--
				799		
				861		
Ref 4 h		902	934	112.0		
		922				
		978				
		846				
Ref 24 h		907	891	106.9		
		921				

Residual ratio (%) = mean value after storage/mean initial value × 100

Ref: in a refrigerator, --: not applicable

3. P092 マレイン酸塩の分析法 バリデーション

最終報告書

P092・マレイン酸塩の分析法バリデーション

(試験番号：P140704)

本写しは原本と相違ありません
株式会社 LSIメディエンス 熊本研究所
2015年2月16日
試験責任者 古原 孝幸

株式会社 L S I メディエンス